

**Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlova v Praze**  
**Katedra experimentální biologie rostlin**

Studijní program: Biologie

Obor: Biologie



**Barbara Kramná**

Role NO v senescenci rostlin  
The role of NO in plant senescence

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Naďa Wilhelmová, CSc.  
Konzultant: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha, 2013

**Poděkování:**

Chtěla bych srdečně poděkovat své školitelce RNDr. Nadě Wilhelmové, CSc. za užitečné rady, velkou trpělivost, vstřícnost a všechnen čas, který mi věnovala. Díky patří také RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. za dobré rady a ochotu.

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu.

V Praze, 08. 05. 2013

Podpis

## **Abstrakt**

Oxid dusnatý (NO) je plynný radikál lipofilního charakteru, který dokáže samovolně difundovat membránami, a tak ovlivňovat okolí svého vzniku bez ohledu na buněčná propojení. Přestože jeho poločas života je nejčastěji pouze v řádu vteřin, řadí se mezi významné regulátory rostlinného vývoje. Molekula NO svými účinky provází rostlinu skrze celý životní cyklus a pracuje převážně skrze ovlivnění genové exprese a posttranslační modifikace. Mimo její samovolný vznik v redukčních podmínkách byla dokumentována enzymatická produkce v apoplastu, cytoplasmě a některých organelách, např. mitochondrie, chloroplasty a peroxisomy. Výsledné toxické či ochranné působení NO je závislé na koncentraci, přičemž její vysoká hodnota znamená buněčné poškození.

Senescenci rostlin ve většině případů provází rozsáhlé oxidativní poškození buněk projevující se zvýšením koncentrace některých ROS, jako  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ , peroxidací lipidů a mj. i snížením aktivity antioxidačních enzymů. NO dokázal zvrátit či přímo zabránit tvorbě senescenčního fenotypu rostlin, které byly vystaveny mnoha stresovým podmínkám, které by bez jeho přítomnosti vedly k senescenci. Pro NO se tak nabízí role negativního regulátoru senescence. Nejčastějším postupem pro modulaci obsahu NO v rostlinných tkáních je, krom tvorby mutantních a transgenních rostlin, aplikace donorů NO.

**Klíčová slova:** oxid dusnatý, senescence, ROS,  $H_2O_2$ , donory NO

## **Abstract**

Nitric oxide (NO) is a lipophilic free radical gaseous molecule able to readily diffuse through membranes and thus influence the adjacent cells from its source. It belongs among important physiological modulators of a plant life despite of its short life span, which is in most cases, only a few seconds. NO influences plants during their whole life cycle and predominantly acts via a modulation of gene expression or post-translation modifications. An enzymatic production of NO has been documented in apoplast, cytosol and organelles such as mitochondria, chloroplasts and peroxisomes, apart from its spontaneous production in reducing conditions. The possible cytoprotective or cytotoxic effects of NO in plant cells depends on its concentration. High concentrations have been proved to be rather cytotoxic.

Plant senescence is often accompanied by a vast oxidative damage, which results in high concentrations of ROS, such as  $O_2^{\cdot-}$  and  $H_2O_2$ , lipid peroxidation and a decrease of antioxidant enzymes activities. NO has been proved to retard or entirely prevent a senescent phenotype of stress-treated plants. Thus a role as a negative regulator of plant senescence has been proposed for it. The most often method used for NO level modulation in plant tissues is an exogenous application of various NO donors. Other methods use mutant or transgenic plants.

**Key words:** nitric oxide, senescence, ROS,  $H_2O_2$ , NO donors

## Obsah

<b>Abstrakt .....</b>	<b>3</b>
<b>Obsah .....</b>	<b>5</b>
<b>Seznam použitých zkratk .....</b>	<b>6</b>
<b>Úvod .....</b>	<b>7</b>
<b>1. NO .....</b>	<b>8</b>
1.1. Chemické vlastnosti a reaktivita .....	8
1.2. Biologické vlastnosti .....	8
1.2.1. Uplatnění v biologických procesech .....	8
1.2.2. Abiotický a biotický stres .....	10
1.3. Syntéza v rostlinách .....	11
1.3.1. Enzymatická cesta .....	11
1.3.2. Ne-enzymatická cesta .....	12
1.4. Signalizace .....	13
1.4.1. Regulace genů .....	13
1.4.2. Post-translační modifikace .....	13
1.4.3. Guanylylcyklasa a cGMP .....	14
<b>2. SENESCENCE .....</b>	<b>15</b>
2.1. Účel .....	15
2.2. Vnější a vnitřní faktory .....	15
2.3. Genová exprese .....	16
<b>3. NO V SENESCENCI .....</b>	<b>17</b>
3.1. Objev role NO v senescenci .....	17
3.2. Lokalizace NO v rostlinných buňkách .....	18
3.3. Efekt NO na oxidativní poškození .....	19
3.3.1. <i>nos1</i> mutanty .....	19
3.3.2. Indukovatelná senescence působením H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> a methyl-jasmonátu .....	20
3.3.3. Represe produkce superoxidového radikálu .....	21
3.4. Metabolismus NO v senescenci .....	21
3.5. Genová exprese a její ovlivnění NO .....	22
3.6. Vliv Ca <sup>2+</sup> iontů .....	23
3.7. NO jako obrana proti senescenci .....	23
3.7.1. Vodní deficit .....	23
3.7.2. ABA .....	24
3.8. NO v interakci s ethylenem .....	25
3.8.1. Fyziologické studie .....	25
3.8.2. Genetické studie .....	25
3.9. Cytokininy .....	27
3.9.1. Inhibice senescence .....	27
3.9.2. NO signalizace .....	27
3.10. NO a symbióza .....	28
3.10.1. Přítomnost NO v hlízkách .....	28
3.10.2. Senescence hlízek .....	29
3.11. NO donory .....	29
3.11.1. <i>In vitro</i> .....	29
3.11.2. <i>In planta</i> .....	30
<b>Závěr .....</b>	<b>31</b>
<b>Citovaná literatura .....</b>	<b>32</b>

## Seznam použitých zkratek

**ABA** (abscisic acid) kyselina abscisová

**APOD** (ascorbate peroxidase) askorbátperoxidasa

**AtNOA1** (*Arabidopsis thaliana* NO-associated protein 1)

**AtNOS1** (*Arabidopsis thaliana* NO synthase) *Arabidopsis thaliana* NOsyntasa

**CAT** (catalase) katalasa

**cPTIO** 2-(4-carboxyfenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid

**GR** (glutathione reductase) glutathionreduktasa

**GSH** (glutathione) glutathion

**GSNO** (S-nitrosoglutathione) S-nitrosoglutathion

**JA** (jasmonic acid) kyselina jasmonová

**L-NAME** (N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine methyl ester)

**L-NMMA** (L-N<sup>G</sup>-monomethyl-arginine)

**MDA** (malondialdehyde) malondialdehyd

**MeJA** (methyl jasmonate) methyljasmonát

**NI-NOR** (nitrite:NO reductase) nitrit:NOreduktasa

**NOS** (NO synthase) NO-syntasa

**NR** (nitrate reductase) nitrátreduktasa

**PBN** (N-*tert*-butyl- $\alpha$ -phenylnitron)

**PCD** (programmed cell death) programovaná buněčná smrt

**RNS** (reactive nitrogen species) reaktivní formy dusíku

**ROS** (reactive oxygen species) reaktivní formy kyslíku

**RSNO** (S-nitrosothiol) S-nitrosothiol

**SA** (salicylic acid) kyselina salicylová

**Sin-1** (3-morpholinosydnnonimine)

**SNAP** (S-nitroso-N-acethyl-penicillamine)

**SNP** (sodium nitroprusside) nitroprusid sodný

**SOD** (superoxid dismutase) superoxiddismutasa

**TMV** (tobacco mosaic virus) virus tabákové mozaiky

## Úvod

Významné postavení molekuly oxidu dusnatého ve fyziologii bylo objeveno v 80. letech minulého století u živočichů, a v posledních letech k obdobným výsledkům dochází i fyziologie rostlinná. Plynné skupenství a radikálový charakter této fascinující molekuly poskytují základ jejího širokého uplatnění při ovlivňování životních pochodů organismů. U rostlin byla prokázána role NO v raných vývojových procesech až po ovlivnění kvetení a fertility rostlin (Beligni and Lamattina, 2000, He *et al.*, 2004). Nové poznatky byly získány i ve spojitosti NO a rostlinného stresu. Ať musí rostlina čelit stresu biotickému, způsobenému interakcí s jinými organismy, nebo stresu abiotickému navozenému vnějšími podmínkami, molekula NO se ukázala být velmi důležitou.

Oxid dusnatý může v rostlinách vznikat několika způsoby. Byl popsán jeho vznik cestou enzymatickou, přestože na objev typické NO-syntasy, jakou můžeme najít hned v několika verzích u živočichů, se stále čeká. Přestože je metabolismus dusíku jednou z nejdůležitějších metabolických drah, které u rostlin nacházíme, neenzymatická produkce NO byla také mnohokrát dokumentována. Šíře účinků NO zahrnuje modifikace jednotlivých proteinů až po ovlivnění genové exprese. Nicméně díky rozmanitému buněčnému prostředí podléhá i molekula NO dalším přeměnám, a tak dává vzniknout skupině molekul, které mohou také ovlivňovat buněčné funkce a souhrnně se nazývají RNS – reaktivní formy dusíku.

Mezi intenzivně zkoumané patří i uplatnění NO během senescence a programované buněčné smrti. Oba zmíněné procesy zahrnují přísně regulované dráhy. V případě senescence je hlavním úkolem metabolicky přeměnit a následně alokovat látky, které mohou najít využití v dalším vývoji rostliny v jiných orgánech. Cílem programované buněčné smrti (PCD) je řízená smrt rostlinné buňky bez poškození přilehlých pletiv. Funkce NO během těchto rostlinných pochodů je napojena na další molekulární hráče jako reaktivní formy kyslíku (ROS),  $\text{Ca}^{2+}$ , kyselina jasmonová (JA), kyselina salicylová (SA) a v neposlední řadě i některé fytohormony. Jednotlivé interakce a jejich výsledek závisí na dalších aspektech jako např. koncentrace přítomného NO, mechanismus jeho vzniku, stáří či samotný druh rostliny.

Tudíž poznání role samotného NO v senescenci rostlin a jeho propojení s dalšími regulátory vývoje nám pomůže nejen v rámci základního výzkumu. Získané informace nám mohou pomoci v poli aplikačním, např. při tvorbě vhodných ošetřovacích technik pro průmyslově pěstované plodiny za cílem prodloužení životnosti jak celých rostlin, tak sklizených plodů. Cílem této práce je stručně představit NO v rostlinné fyziologii s hlavním soustředěním na jeho roli v senescenci rostlin.

## 1. NO

### 1.1. Chemické vlastnosti a reaktivita

Oxid dusnatý je molekulou s jedním nepárovým elektronem, který dává molekule typický radikálový charakter a reaktivitu. Chemické radikály se obecně považují za velmi reaktivní molekuly, které mohou reagovat s mnoha dalšími chemickými sloučeninami a snadno tvořit dimery. Mezi základní reakce patří konverze NO na oxid dusičitý  $\text{NO}_2$  v přítomnosti kyslíku. Tento proces probíhá velmi rychle při vysokých koncentracích reaktantů a jeho výsledkem je tmavě hnědý plyn. Tato reakce v přítomnosti vody dává vznik dusitanu  $\text{NO}_2^-$ , který pak může být oxidován až na dusičnan  $\text{NO}_3^-$ . NO také přímo reaguje s  $\text{NO}_2$  za tvorby oxidu dusitého  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Dále je významná reakce NO se superoxidovým radikálem,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , která dává vzniknout peroxydusitanu  $\text{OONO}^-$ . Tato molekula je velmi reaktivní a může se následně rozkládat za vzniku reaktivního hydroxylového radikálu a  $\text{NO}_2$  (Butler *et al.*, 1995).

Cílové molekuly, se kterými NO v buňkách nejčastěji reaguje, obsahují kyslík, thiolové skupiny a také kovy. Pokud se NO vyskytuje v prostředí s dostatkem vhodných molekul, poločas jeho života bude velmi krátký v řádu vteřin. Výsledek možných interakcí má na následnou aktivitu NO rozdílný vliv. Při reakci NO s kyslíkem ( $\text{O}_2$ ) vznikem dusitanu ( $\text{NO}_2^-$ ) či dusičnanu ( $\text{NO}_3^-$ ) dochází k inaktivaci NO pro další funkce. Zatímco při reakci s již zmíněnými thiolů, kovy jako např. železo, či dalšími radikály, dochází ke vzniku molekul, které mohou dále pokračovat v signalizaci a ovlivňování buněk. Vzhledem k tomu, že NO dokáže reagovat s prostetickými skupinami obsahujícími železo a thiolovými skupinami proteinů, může tak docházet k tvorbě komplexů, které mohou aktivovat či deaktivovat cílové enzymy. Tímto mechanismem NO pravděpodobně ovlivňuje aktivitu solubilní guanylylcyklasy (GC), která katalyzuje tvorbu cyklického GMP (cGMP) (Billiar, 1995).

Významná odlišnost molekuly NO od dalších buněčných mediátorů tkví v tom, že má lipofilní charakter. To jí umožňuje bez problému difundovat membránami a ovlivňovat buňky v blízkém okolí svého vzniku bez ohledu na jejich propojení.

### 1.2. Biologické vlastnosti

#### 1.2.1. Uplatnění v biologických procesech

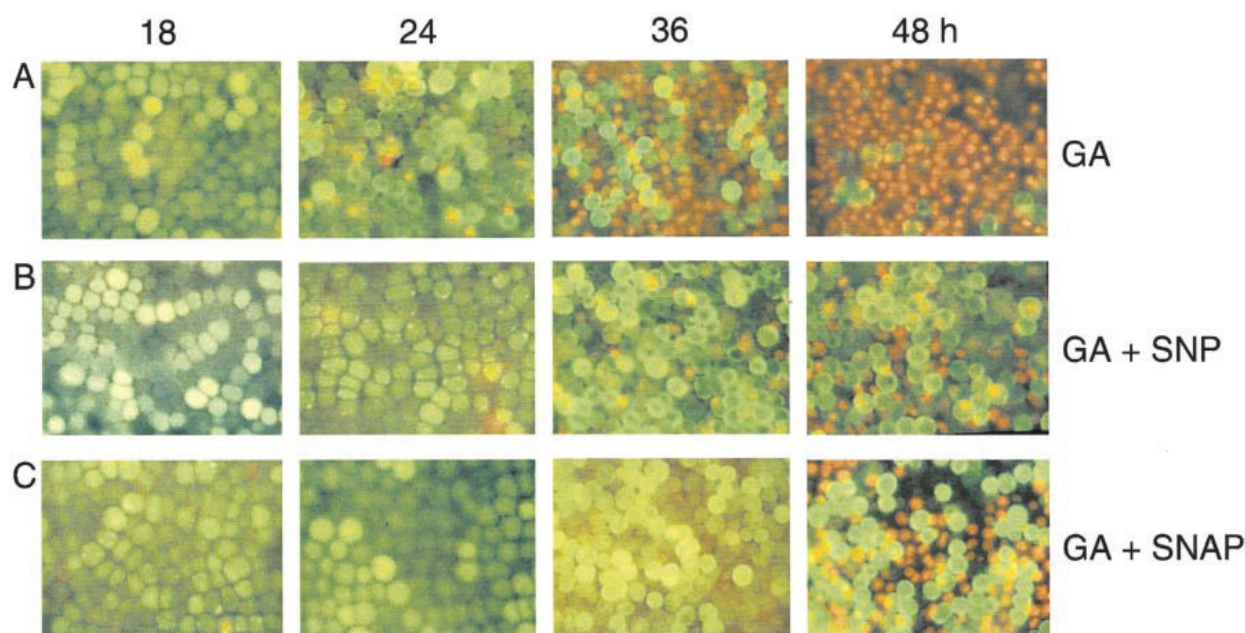
Chemické vlastnosti NO umožňují široké ovlivnění procesů během růstu a vývoje rostliny. Nejčastější se zdají být interakce NO s ROS a výsledné účinky mohou mít jak charakter ochranný, tak cytotoxický. To, zda-li ve výsledku převáží pozitivní či negativní ovlivnění fyziologie rostliny z velké



části záleží na koncentraci reaktantů. V potaz se ale musí brát i další buněčné podmínky (Beligni and Lamattina, 1999).

Bylo prokázáno, že NO stimuluje zrání semen, de-etiolizaci a inhibuje růst hypokotylu. Všechny tyto procesy jsou závislé na světle a jejich vnímání přes fytochromy se z části uplatňuje přes zvýšenou hladinu cGMP, ale také skrze trimerické G-proteiny a  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulinový systém. Jelikož NO prokázal mít podobné účinky jako světlo, je pravděpodobné, že jeho působení se odehrává pomocí stejných mechanismů. Ošetření semen lociky (*Lactuca sativa* L. cv. Grand Rapids) donory NO nitroprusidem sodným (SNP) a S-nitroso-N-acetylpenicilaminem sodným (SNAP) podpořilo zrání semen umístěných ve tmě, v podmínkách (26°C), kdy je tento proces závislý pouze na světle. Úspěšnost klíčení byla úměrná koncentraci donoru NO. Aplikace 100  $\mu\text{M}$  SNP a SNAP přinesla podobnou úspěšnost okolo 98 %, po aplikaci 10  $\mu\text{M}$  SNP byla úspěšnost klíčení okolo 50 %. Dále u klíčících rostlinek pšenice umístěných do tmy a ošetřených donory NO byl následně zjištěn obsah chlorofylu vyšší než u rostlin kontrolních (Beligni and Lamattina, 2000).

NO také dokázal zbrzdit nástup PCD v aleuronových vrstvách semen ječmene (*Hordeum vulgare*) ošetřených gibereliny (GA), aniž by jakkoli viditelně ovlivnil celkový metabolismus buněk či syntézu  $\alpha$ -amylasy. U semen ošetřených donory NO spolu s GA nedošlo k výraznému poklesu aktivit katalasy (CAT) a superoxiddismutasy (SOD), enzymů uplatňujících se v metabolismu ROS. Tento výsledek potvrzuje předpoklad, že NO dokáže interagovat s ROS a v tomto případě má ochranné antioxidační účinky (Beligni *et al.*, 2002).



**Obr. 1.** Fluorescenčně značené buňky aleuronových vrstev ječmene (*Hordeum vulgare*), u kterých aplikace donorů NO SNP a SNAP zbrzdila nástup PCD. Vrstvy (A-C) byly ošetřeny 5  $\mu\text{M}$  GA. (B) za přidání 100  $\mu\text{M}$  SNP, (C) 300  $\mu\text{M}$  SNAP po vyznačenou dobu. Červené buňky jsou mrtvé. Převzato z (Beligni *et al.*, 2002).

Při zkoumání dalších signálních rolí NO byl u *Arabidopsis thaliana* identifikován mutant *nos1*, u něhož vzniká minimum NO v důsledku poškození syntetické dráhy. Mezi typické fenotypové projevy těchto rostlin patřil omezený orgánový růst a potlačené stomatální pohyby indukované kyselinou abscisovou (ABA). Konkrétně v časně fázi vývoje klíčnicích rostlinek byly první pravé listy nažloutlé a obsahovaly méně chlorofylu. U dospělých rostlin byl pozorován omezený růst jak stonkový tak i kořenový. Plodnost mutantních rostlin byla ve srovnání s kontrolními také snížena. U mutovaných rostlin nebyla pozorována tvorba NO indukovaná ABA v signální dráze vedoucí k uzavírání a otevírání průduchů (Guo *et al.*, 2003).

Mezi vývojové procesy, které NO u rostlin ovlivňuje, patří i přechod ke kvetení. Exogenní aplikace NO u *Arabidopsis thaliana* podpořila vegetativní růst a zbrzdila vývoj směrem ke tvorbě reprodukčních orgánů. Stejný výsledek vykazovaly i *nox1* mutanty, které mají zvýšenou produkci NO. Naopak *nos1* mutanty, které syntetizují minimum NO, kvetly dříve (He *et al.*, 2004).

Z uvedených dat vyplývá, že molekula NO hraje v životě rostliny svou roli od úplných počátků, během vegetativního vývoje až k ovlivnění přechodu do fáze reprodukční. Zkoumání jejího vlivu na různých druzích rostlin pouze potvrzuje její univerzálnost vycházející z chemických vlastností.

### 1.2.2. Abiotický a biotický stres

Díky převážně sesilnému charakteru svého života musejí mít rostliny řadu mechanismů pro vyrovnání se s měnícími se podmínkami prostředí, ve kterém rostou. Stresové situace mohou vyvstat z působení fyzikálních a chemických faktorů jako je mj. nízká nebo vysoká teplota, nadměrné světelné ozáření, sucho nebo zasolení půdy. Působení těchto podmínek označujeme jako abiotický stres. Stres biotický je vyvolán interakcí s jinými organismy např. patogenními mikroorganismy, popř. herbivory.

Gould *et al.* (2003) u buněk listů tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi) zkoumali, zda-li vznik NO může značit, podobně jako v případě ROS, obecnou odpověď rostlin na různé podmínky abiotického stresu. Vysoké teploty, hyperosmotický stres navozený působením sorbitolu a stres vyvolaný přítomností NaCl tuto teorii potvrdily. Nicméně světelné ozáření do 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  a mechanické poranění nevedly k jeho signifikantní produkci. I když vznik NO tedy může být způsoben více různými stresory, neznamená univerzální rostlinou stresovou odpověď.

Durner *et al.* (1998) zjistili u rezistentních tabákových rostlin (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi), že po infekci mozaikovým virem tabáku (TMV) došlo ke zvýšení aktivity NOS. Po ošetření donory NO také došlo k zvýšení exprese obranných genů kódujících proteiny související s patogenezí, angl. pathogenesis-related (PR-1) a phenylalaninamoniaklyasu (PAL). Ve výsledku tak zvýšená hladina NO,

bez ohledu na způsob jeho vzniku, způsobila akumulaci PR-1 proteinu. K navýšení exprese PAL došlo prostřednictvím guanylylcykasy a zvýšené hladiny cGMP.

Molekula NO je také společně s ROS nezbytná pro zajištění hypersenzitivní reakce vyvolané přítomností rostlinného patogenu. Hlavním úkolem tohoto obranného mechanismu je zabránit rozšíření patogenu z místa infekce i za cenu odumření primárně napadených buněk. Tato skutečnost byla dokázána u sóji (*Glycine max* cv. Williams 82) infikované *Pseudomonas syringae* a střídavou aplikací donorů NO s exogenním dodáním  $H_2O_2$  a  $O_2^-$ . Stejně tak i navozením podmínek, při kterých dochází ke zvýšení endogenní produkce zmíněných reaktantů. Tyto výsledky byly potvrzeny i za přítomnosti cPTIO, molekuly reagující s NO a zabraňující jeho buněčné aktivitě. V případě listů *Arabidopsis thaliana* infikovaných *Pseudomonas syringae* a za dodání blokátorů NO syntézy došlo k výraznému omezení hypersenzitivní reakce a zvýšenému bakteriálnímu růstu spojenému s následným šířením patogenu rostlinou (Delledonne *et al.*, 1998).

### 1.3. Syntéza v rostlinách

#### 1.3.1. Enzymatická cesta

Redukce dusičnanu ( $NO_3^-$ ) na dusitan ( $NO_2^-$ ) je prvním krokem v nejčastější cestě příjmu dusíku rostlinou. Enzym zodpovědný za tuto reakci, nitrátreduktasa (NR), nicméně dokáže za daných podmínek redukovat dusitan až na NO. Proto se uvažovalo o významném uplatnění tohoto enzymu přímo v produkci NO. Tento předpoklad byl ověřen pokusy s NR izolovanou ze semen kukuřice (*Zea mays* L.), která prokazatelně NO produkovala a to v přítomnosti dusitanu, NADH jako donoru elektronů a při pH 7. Dalšími pokusy bylo zjištěno, že NR je schopna následné přeměny NO na peroxodusitan ( $ONOO^-$ ) pokud má k dispozici superoxid ( $O_2^-$ ), a že tato reakce byla inhibována v anaerobním prostředí. NR se tedy významně podílí jak na produkci samotného NO, tak i na vzniku dalších reaktivních forem dusíku (RNS) (Yamasaki and Sakihama, 2000).

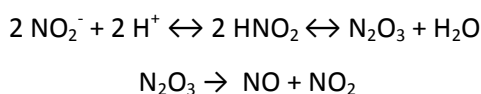
Dalším enzymem schopným tvorby NO je na plasmatickou membránu vázaná nitritreduktasa, jejíž aktivita byla prokázána v kořenech tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun). Protože se produkt jí katalyzované reakce liší od nitritreduktasy přítomné v plastidech, která dává vznik i amoniaku ( $NH_3$ ), přesnější označení je nitrit:NOreduktasa (NI-NOR). Na rozdíl od NR jako donor elektronů využívá redukováný cytochrom c a pH optimum je nejbližší hodnotě 6 (Stohr *et al.*, 2001).

U živočichů probíhá syntéza NO pomocí enzymu NO-syntasy (NOS), která má tři základní isoformy a katalyzuje oxidaci L-argininu na citrulin za přítomnosti NADPH jako donoru elektronů v monooxygenasové reakci (Billiar, 1995). Předpokládalo se, že podobný enzym se musí nacházet i u rostlin. Guo *et al.* (2003) skutečně u *Arabidopsis thaliana* identifikovali protein AtNOS1 (*Arabidopsis*

*thaliana* NO synthase 1) zodpovědný za syntézu NO, který vykazoval určitou funkční podobnost s některými živočišnými NOS. Jako substrát používal arginin spolu s NADPH a byl aktivován  $\text{Ca}^{2+}$  a kalmodulinem. Nicméně nebyla potvrzena sekvenční podobnost s jakoukoli živočišnou isoformou. Novější data navíc prokázala, že sám AtNOS1 není schopen vazby argininu a produkce NO. Nejedná se o NOS, ale o GTPasu, která specificky váže GTP a hydrolyzuje jej na GDP. Označení AtNOS1 bylo následně změněno na AtNOA1 (*Arabidopsis thaliana* NO-associated protein 1) (Moreau *et al.*, 2008). Hledání typické NOS, která by svým fungováním v rostlinném organismu odpovídala těm živočišným, pokračuje dál.

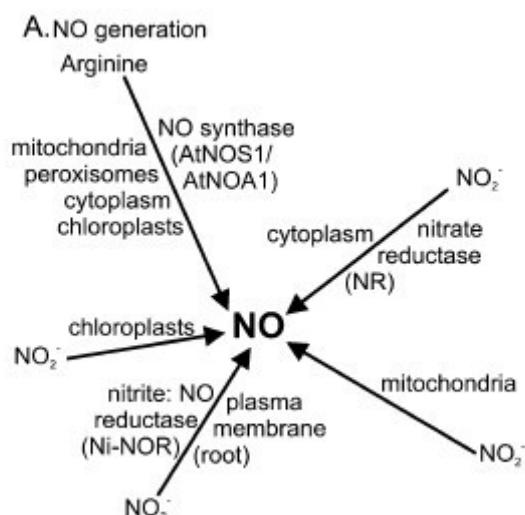
### 1.3.2. Neenzymatická cesta

Ke vzniku NO může docházet i bez účasti enzymů a to redukcí dusitanu, kdy k nezanedbatelné produkci dochází v kyselém prostředí a nejlépe i v přítomnosti redukčního činidla. Za těchto podmínek se dusitan protonuje a vytvoří kyselinu dusitou  $\text{HNO}_2$ . V další reakci poskytuje oxid dusitý  $\text{N}_2\text{O}_3$ , který se následně rozkládá za vzniku NO spolu s  $\text{NO}_2$  (viz chemická rovnice), (Yamasaki, 2000).



Tento děj byl prokázán u aleuronových vrstev semen ječmene (*Hordeum vulgare*), kdy po přidání dusitanu do média, ve kterém byly inkubovány, došlo k zvýšené produkci NO. Společně s ověřením, že přítomnost NO zpomaluje PCD v buňkách aleuronových vrstev (Beligni *et al.*, 2002), byl potvrzen neenzymatický vznik NO snížením koncentrace dusitanu v médiu. Dále bylo zjištěno, že tato reakce je závislá na pH, kdy v kyselém prostředí docházelo k vyšší produkci NO a zároveň rychlejšímu úbytku dusitanu. Tato skutečnost pravděpodobně omezuje neenzymatický vznik NO z  $\text{NO}_2^-$  pouze na některé oblasti rostliny, jako např. apoplast (Bethke *et al.*, 2004).

Oxid dusnatý je v největší míře produkován enzymaticky v cytoplasmě, kde se mu následně naskýtá široké spektrum molekul, se kterými může reagovat a ovlivňovat tak buněčné funkce. Jeho organelový vznik a následné působení je vázáno na konkrétní dráhy, které v daných organelách probíhají. V případě mitochondrií se jedná o respirační řetězec, u chloroplastů o asimilaci uhlíku. Výše popsané rozmanité chemické vlastnosti NO mu umožňují fungovat v různých částech buňky lišících se např. pH či koncentrací ROS.



**Obr. 2.** Schéma zobrazující různé způsoby vzniku NO v rostlinných buňkách. NO může být syntetizován z dusitanu pomocí NR. Některá data naznačují zapojení NOS v L-Arg závislé reakci, i když protein AtNOS1 není považován za NOS. Dále existují důkazy pro zapojení nitrit:NOreduktasy fungující v kořenech a pro možnosti vzniku NO z dusitanu v chloroplastech a mitochondriích (Neill *et al.*, 2008).

## 1.4. Signalizace

### 1.4.1. Regulace genů

Z některých studií vyplývá, že geny, které NO ovlivňuje, jsou převážně spojeny se stresem (Gould *et al.*, 2003). Nicméně dalším výzkumem se potvrdilo, že svým účinkem pokrývají široké spektrum dalších funkcí. Od rostlinných obranných reakcí přes odpověď na oxidativní stres způsobený ROS, přes hormonální signalizaci až po vývojové procesy (Delledonne *et al.*, 1998; Beligni *et al.*, 2002; Guo *et al.*, 2003; Beligni and Lamattina, 2000). Mechanismus ovlivnění zahrnuje působení přes proteinkinasy, nebo ovlivnění transkripčních faktorů pomocí posttranslačních modifikací.

### 1.4.2. Posttranslační modifikace

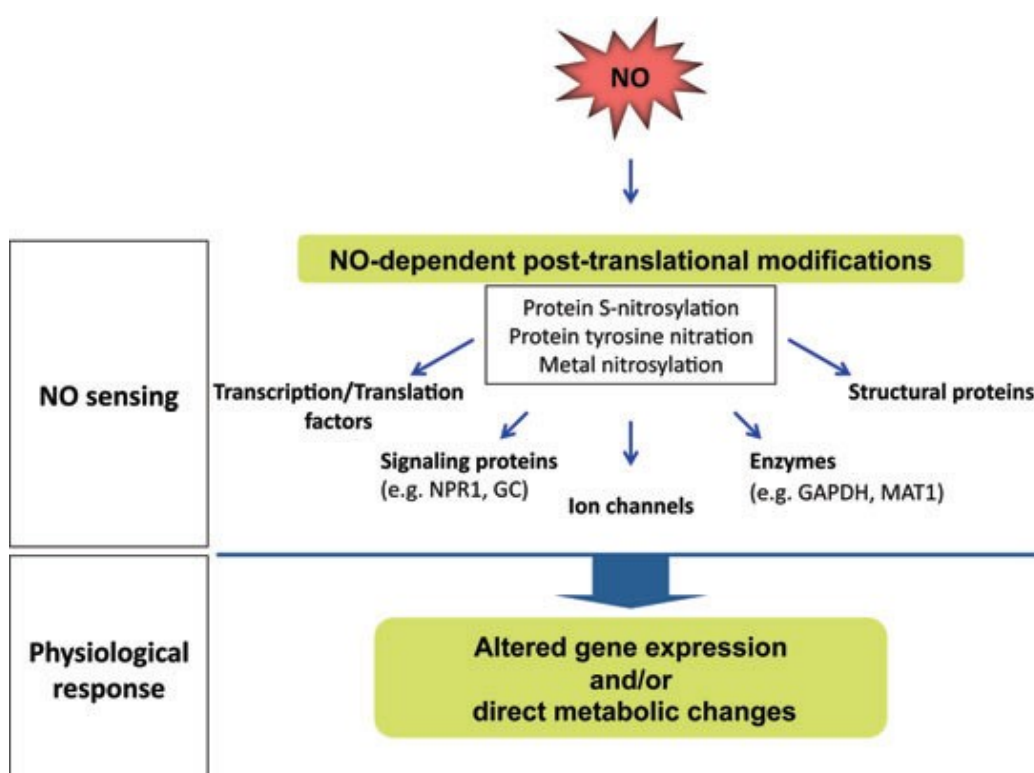
NO ovlivňuje většinu proteinů pomocí S-nitrosylace přes specifický cysteinový zbytek. K této reakci dochází buď přímou reakcí v závislosti na kyslíku, nebo pomocí přenosu NO z molekuly nitrosothiolu (RSNO) na sulfhydrylovou skupinu (-SH) konkrétního proteinu. Lindermayr *et al.* (2005) ošetřili buněčné kultury a následně celé rostliny *Arabidopsis thaliana* donory NO i plyným NO s cílem podpořit tvorbu nitrosothiolů. Poté identifikovali spektrum S-nitrosylovaných proteinů, které obsahovalo proteiny spojené se stresem, signalizačně-regulační, ovlivňující redoxní stav buňky, metabolické enzymy a také cytoskeletární proteiny.

K dalším posttranslačním modifikacím ve spojitosti s NO řadíme i nitraci, jejímž výsledkem je především 3-nitrotyrosin, který vzniká připojením nitro skupiny ( $\text{NO}_2^-$ ) do ortho pozice Tyr zbytku.

Nitro skupina pochází převážně z peroxydusitanu  $\text{ONOO}^-$ . Tento proces může ve výsledku ovlivnit konformaci spolu se strukturou proteinu, popř. jeho katalytickou aktivitu nebo náchylnost k degradaci. Celá škála nitrací ovlivněných proteinů není přesně známa, nicméně některé doposud identifikované nitrosylované proteiny patřily do více skupin ovlivňující procesy fotosyntézy, metabolismus dusíku a glykolysu (Cecconi *et al.*, 2009).

#### 1.4.3. Guanylylcyklasa a cGMP

Možné působení NO na enzymy za vzniku druhých posílů se zkoumalo společně s aktivací obranných genů, konkrétně PAL. Navržena byla signální dráha, ve které by NO působil na guanylylcyklasu (GC) za vzniku cGMP, které by mohlo ovlivnit genovou expresi (Durner *et al.*, 1998). Konkrétní identifikaci enzymu vázajícího NO s guanylylcyklasovou aktivitou provedli u *Arabidopsis thaliana* Mulaudzi *et al.* (2011). Jedná se o protein flavinmonooxygenasu AtNOGC1 (*Arabidopsis thaliana* NO-guanylyl cyclase 1), která má vyšší afinitu pro NO než  $\text{O}_2$  a v podmínkách *in vitro* generuje cGMP z GTP. Její aktivita je závislá na NO a AtNOGC1 tak představuje důležitý článek v signalizačních drahách rostlin.



**Obr. 3.** Zjednodušená ilustrace možné NO signalizace. Pro přenos signálu je nejprve potřeba citlivé detekce. Vnímání přítomnosti NO je založeno na posttranslačních modifikacích zahrnující S-nitrosylaci proteinů, nitraci proteinových tyrosinů a nitrosylaci kovů. Tyto modifikace změnou genové exprese nebo přímým metabolickým ovlivněním ve výsledku indukují rozmanité fyziologické odpovědi rostlin. Převzato z (Moreau *et al.*, 2010).

## 2. SENESCENCE

### 2.1. Účel

Senescencí je označen přísně regulovaný proces, který je poslední etapou přirozeného rostlinného vývoje. Její průběh je provázen komplexními metabolickými změnami, jejichž cílem je recyklace a následná alokace živin. Tento proces postihuje většinu částí rostliny jako např. květy a plody (Leshem *et al.*, 1998). Nicméně nejvíce je zkoumána senescence listů, jelikož list je ve většině případů hlavním asimilačním orgánem. Při jeho vývoji se v něm díky asimilačním drahám, hlavně fotosyntéze, akumuluje velké množství proteinů a dalších nezbytných stavebních komponent. Takto uloženou energii může rostlina využít po indukci senescence, kdy po odbourání makromolekul jsou živiny přesunuty do částí, kde je jich aktuálně potřeba. U dřevin dochází primárně k ukládání ve specializovaných buňkách kmene, u jednoletých rostlin jsou živiny využity na tvorbu semen pro příští generaci. Konečným stádiem senescence je buněčná smrt. Nicméně i tato fáze je regulována a oddalována do chvíle, než jsou živiny převedeny jinam (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

### 2.2. Vnější a vnitřní faktory

Není pochyb o tom, že senescence je komplexní proces ovlivňovaný na mnoha úrovních. Kromě genetického základu rostlina vnímá a integruje informace přicházející z prostředí spolu s endogenními faktory. V případě signálů z vnějšího prostředí se jedná především o stresové působení vlivem sucha, nízkých či vysokých teplot, nedostatku živin, zastíněním či interakcí s patogeny. Odpovědí na stresovou situaci může být urychlená senescence a ukazuje tak určitou adaptivní funkci, kdy rostlina jako celek může pokračovat v růstu či dokončit svůj životní cyklus i za nepříznivých podmínek za cenu ztráty orgánu, nejčastěji listu (Gan and Amasino, 1997). Ve většině případů se ale jedná o vztah opačný, kdy až samotný nástup senescence spouští stresové reakce. Množství genů, k jejichž indukci dochází v odpovědi na působení různých stresorů, má u *Arabidopsis* zvýšenou expresi i během senescence listů. Navíc i celková signalizace v obou případech je do jisté míry podobná, i když ne identická (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

K endogenním vlivům, které rostlina vnímá, řadíme celkový věk listu a hladiny fytohormonů (Gan and Amasino, 1997). SA spolu s JA představují komponenty uplatňující se v signalizaci při napadení rostliny patogenem a také během stresových reakcí. Při dalším zkoumání se ověřila jejich role i v dalších vývojových procesech a zjistilo se, že ovlivňují některé geny přímo spojené s procesem senescence. Nicméně nejedná se o faktory pro její nástup a provedení klíčové (Buchanan-Wollaston

*et al.*, 2003). Funkce a zapojení nejdůležitějších skupin fytohormonů v senescenci bude detailněji popsána dále.

### 2.3. Genová exprese

Prvním důležitým krokem v procesech senescence je degradace chloroplastů, což jsou organely obsahující až 70% listových proteinů. Fotosyntéza se snižuje a je patrný katabolismus chlorofylu a makromolekul jako jsou proteiny, RNA či membránové lipidy. Většina degradačních procesů je řízena přímo z buněčného jádra, k jehož odbourání dochází až ve finálních fázích. Senescence může být zablokována inhibitory syntézy RNA a proteinů, což, dokazuje, že jaderná exprese je pro úspěšný průběh senescence nezbytná (Gan and Amasino, 1997).

Konkrétní procesy zahrnující degradaci chlorofylu, proteinů, lipidů a nakonec i nukleových kyselin jsou řízeny specifickou genovou expresí. Obecně geny, jejichž exprese je při senescenci posílena se označují jako geny související se senescencí – anglicky senescence associated genes (SAGs). Při výzkumu zatím nebyl identifikován mutant, který by měl potlačeny veškeré symptomy senescence díky mutaci v jediném genu. Je to vcelku pochopitelné, jelikož existuje velké množství signalizačních drah, které mají na genovou expresi vliv a které navíc samy zahrnují mnoho komponent. Nicméně novější studie umožnily identifikaci genů vykazujících změny genové exprese během různých vývojových fází listu, a které dále můžeme rozdělit do 4 skupin v závislosti na konkrétním profilu exprese.

První skupina zahrnuje geny, které vykazují zvýšenou expresi během prvních fází senescence a udržují si ji až do fází pozdějších. Můžeme zde zařadit především množství regulačních faktorů jako proteinkinasy a proteinfosfatasy. Do druhé skupiny řadíme geny se stejnou mírou exprese během normálního vývoje a prvních fází senescence. Ke zvýšení jejich exprese dochází v pozdějších fázích senescence a patří sem potenciální enzymy pro degradaci buněčné stěny jako  $\beta$ -glukosidasa. Geny třetí skupiny jsou exprimovány ve vyšší míře při normálním vývoji listu v době, kdy si zachovává zelenou barvu. Po nástupu senescence se ale jejich exprese výrazně snižuje. Tato skupina zahrnuje geny kódující proteiny vázající molekuly chlorofylu v pigment-proteinových komplexech. Čtvrtá skupina zahrnuje poměrně malé množství genů, jejichž exprese je zvýšena během prvních fází senescence, ale postupně klesá s jejím průběhem (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

Problematika regulace genové exprese je velmi komplexní a jakékoli řazení genů do předem definovaných skupin je tak do jisté míry zjednodušením. Nicméně díky neustále se zlepšujícím se sekvenačním technikám se nám dostává stále více přesnějších dat, se kterými se dá pracovat.



### 3. NO V SENESCENCI

#### 3.1. Objev role NO v senescenci

Leshem *et al.* (1998) ověřovali hypotézu, podle které molekula NO působí jako regulátor zrání a senescence květů a plodů u vyšších rostlin. Bylo prokázáno, že koncentrace NO byla v nezralém ovoci oproti zralému 4-10x vyšší. Při měření koncentrace v květech *Chamaelaurium uncinatum* a *Telopea speciosissima* bylo zjištěno, že čerstvé květy vykazovaly endogenní koncentraci NO až 2,5x vyšší než senescentní. Tyto výsledky naznačovaly roli NO v procesech zrání a senescence, a tak byla navržena hypotéza, že NO způsobuje zpoždění senescence. Pro potvrzení tohoto předpokladu byla provedena série pokusů jak na vegetativních tak generativních rostlinných orgánech pomocí exogenní aplikace donorů NO jako N-*tert*-butyl- $\alpha$ -phenylnitron (PBN) a 3-morpholinosydnonimine (Sin-1). Společně byla zkoumána i možná vazba na účinky ethylenu, jehož zvýšená koncentrace navozuje a provází proces senescence.

V případě sklizeného ovoce skladovaného v atmosféře obohacené o NO byla prodloužena doba, než došlo k jeho znehodnocení a nemohlo být již dále komerčně využito. Průměrné prodloužení životnosti činilo 117 %. Při sledování účinků koncentrace NO na listy rostlin hrachu (*Pisum sativum*) bylo prokázáno, že působení NO v nižších koncentracích má na listový růst pozitivní účinek. Nicméně po dosažení určitého optima jeho zvýšenou koncentrací provází prudký pokles růstu. Celkové výsledky potvrdily, že produkce NO je výrazně vyšší v mladých částech rostliny oproti dospělým a senescentním. Exogenní aplikací NO lze dosáhnout zpoždění zrání a senescence, nicméně účinky NO jsou dány jeho koncentrací. Dále bylo zjištěno, že mechanismus zpoždění senescence, kterým NO funguje, zahrnuje mj. ovlivnění produkce ethylenu (Leshem *et al.*, 1998).

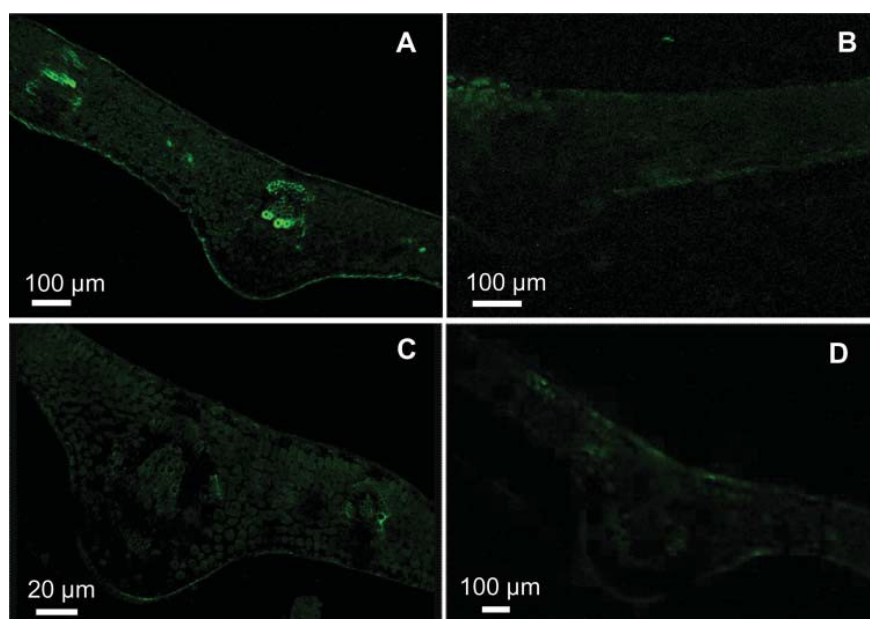
Zkoumání vlivu NO na senescenci děložních lístků sóji (*Glycine max*, var ALM 4500) poskytlo výsledky naznačující jeho ochranný vliv oproti změnám vyvolaným senescencí, které probíhají v těchto časných listových orgánech. Pozorování děložních lístků z 10 a 25 dnů starých kontrolních klíčkových rostlinek omlazených odstraněním epikotylu, či následně ošetřených donorem NO, 0,1 mM SNP, ukázalo rozdíly v obsahu fotosyntetických pigmentů (chlorofyl *a*,  $\beta$ -karoten), v koncentraci samotného NO, lipidových radikálů a v míře propustnosti membrán pro elektrolyty. Přítomnost endogenního NO byla detekována v dělohách z 10 dnů starých kontrolních klíčkových rostlin, ale u 25 denních již ne. U omlazených děložních lístků byla koncentrace endogenního NO v porovnání s kontrolními výrazně vyšší spolu s vysokou úrovní nitrotyrosinových proteinů, více zachovanými membránami a hladinou fotosyntetických pigmentů. Aplikace SNP vyústila ve stabilně vyšší koncentraci endogenního NO a částečně zvrátila senescenční fenotyp daný nízkým obsahem fotosyntetických pigmentů, zvýšenou koncentrací lipidových radikálů a také vyšší propustností

elektrolytů, naznačující poškození buněčných membrán. Mechanismus působení NO může být skrze jeho schopnost narušit reakce vedoucí k peroxidaci lipidů, přes možnost ovlivnění biosyntézy chlorofylu, či přes posttranslační modifikace proteinů, především nitraci (Jasid *et al.*, 2009).

### 3.2. Lokalizace NO v rostlinných buňkách

Pro lepší pochopení fungování NO ve fyziologických procesech bylo třeba objasnit jeho lokální produkci v různých fázích orgánového vývoje. Bylo zjištěno, že biosyntéza NO probíhá v různých tkáních i organelách. Studium celulórní lokalizace NO v mladých listech hrachu (*Pisum sativum*) bylo pozorováno, že k jeho nejvyšší produkci docházelo v cévních svazcích (xylému, floému). Jeho přítomnost, i když v nižší míře, byla detekována i v palisádovém a houbovém parenchymálním mesofylu, svěracích buňkách průduchů a epidermálních buňkách. Oproti tomu v senescentních listech byla jeho produkce výrazně snižena, především v buňkách cévních svazků (Corpas *et al.*, 2004).

Na subcelulární úrovni bylo prokázáno, že NO mj. vzniká enzymaticky v peroxisomech. Nicméně charakteristiky příslušného NOS-like enzymu se liší od AtNOS1 nalezeném u *Arabidopsis thaliana* (Guo *et al.*, 2003). NO je v peroxisomech produkován z L-Arg proteinem, který ke své funkci potřebuje NADPH, BH<sub>4</sub>, kalmodulin, vápník a je inhibován protilátkami proti myší formě iNOS. Během přirozené senescence dochází ke snížení produkce NO tímto enzymem až o 72 % (Corpas *et al.*, 2004).



**Obr. 4.** Imunofluorescenční detekce endogenní produkce NO v listech hrachu (*Pisum sativum*). A, mladý list s nejvyšší produkcí v buňkách cévních svazků. B, mladý list inkubován s 10mM Tris-HCl, pH 7,4, bez přidání fluorescenční značky. C, mladý list inkubován s 5 nM L-NAME (Nω-nitro-L-arginine methyl ester), inhibitor NOS. D, list procházející senescencí s výrazně omezenou produkcí NO, především v cévních svazcích. Převzato z (Corpas *et al.*, 2004).

Pokusy s mitochondriemi izolovanými z listů wild type (WT) rostlin *Arabidopsis thaliana* prokázaly produkci NO závislou na Arg pomocí AtNOS1 enzymu. Ověřením byl omezený vznik NO po aplikaci NOS inhibitorů L-NAME, L-NMMA (L-N<sup>G</sup>-monomethyl-arginin) a látky inaktivující NO cPTIO. Tato produkce byla navíc nepřítomná v mitochondriích *nos1* mutantních rostlin. Mitochondrie představují mj. důležitý regulátor PCD a senescence. Lokalizace vzniku NO v těchto organelách podporuje hypotézy pro jeho uplatnění při zmíněných procesech (Guo and Crawford, 2005). Později bylo zjištěno, že AtNOS1 není ekvivalentem savčích NOS a enzym byl přejmenován na AtNOA1. Nicméně určitým způsobem se při produkci NO uplatňuje (Moreau *et al.*, 2008).

### 3.3. Efekt NO na oxidativní poškození

#### 3.3.1. *nos1* mutanty

Role NO jako molekuly uplatňující se v regulaci procesu senescence byla mj. prokázána pokusy na sklizeném ovoci, u něhož došlo po exogenní aplikaci NO k prodloužení životnosti (Leshem *et al.*, 1998). Následné zkoumání *nos1* mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana*, které mají omezenou produkci NO, potvrdilo jeho uplatnění při mírnění projevů senescence indukované tmou a poskytlo detailnější poznatky o jednotlivých procesech, které ovlivňuje. Porovnání oddělených listů WT a *nos1* rostlin umístěných ve tmě ukázalo, že u listů WT rostlin došlo po 3-4 dnech pouze k mírné ztrátě zelené barvy, zatímco listy mutantních rostlin byly výrazně žluté a poškozené. Tyto výsledky byly potvrzeny měřením obsahu chlorofylu. U *nos1* mutantních listů došlo k jeho snížení o 74 % po 3 dnech a o 91 % po 4 dnech inkubace ve tmě. U WT listů byl naměřen úbytek chlorofylu pouze o 41 % a 55 % po 3, respektive 4 dnech. Aplikací donoru NO SNP na *nos1* mutantní listy došlo ke zmírnění projevů senescence indukované tmou spolu s omezením ztráty chlorofylu. Takto ošetřené listy si uchovaly 43 % chlorofylu po 4 dnech inkubace ve tmě oproti 9 % bez přidání donoru NO. Pokusy s intaktními rostlinami přinesly obdobné výsledky (Guo and Crawford, 2005). Lze tedy říci, že listy, v nichž je výrazně omezen vznik NO, podléhají senescenci rychleji. Opět se potvrzuje role NO jako endogenního regulátoru rostlinné senescence.

Je známo, že NO dokáže interagovat spolu s ROS, ovlivňovat jejich akumulaci a rozsah buněčného poškození. V případě semen ječmene (*Hordeum vulgare*) byl prokázán antioxidační účinek NO během PCD indukované gibereliny (Beligni *et al.*, 2002). Následné zkoumání *nos1* mutantů v souvislosti s obsahem ROS nám poskytlo další informace. Byl zjištěn vyšší obsah H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> jak v klíčcích rostlinkách, tak v listech oddělených z 3 týdny starých *nos1* mutantních rostlin oproti WT rostlinám. Po navození senescence inkubací ve tmě navíc docházelo u *nos1* mutantů k rychlejší akumulaci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Obsah O<sub>2</sub><sup>-</sup> byl na počátku obdobně vyšší u *nos1* mutantů oproti WT rostlinám. Nicméně po navození

senescence nedošlo u mutantních rostlin k jeho navýšení. Tyto výsledky naznačují, že NO, podle autorů vzniklý NOS-like enzymem, potlačuje akumulaci  $\text{H}_2\text{O}_2$  spolu s  $\text{O}_2^{\cdot-}$  v mladých klíčcích rostlin a obsah  $\text{H}_2\text{O}_2$  během senescence indukované tmou (Guo and Crawford, 2005).

Akumulace ROS u *nos1* mutantů způsobila nadměrné poškození ve formě přímé degradace proteinů oproti WT rostlinám. Tento efekt byl ještě výraznější při senescenci navozené inkubací ve tmě, kdy ztráta funkčních proteinů korelovala s maximální hladinou  $\text{H}_2\text{O}_2$  po 3 dnech v tmavých podmínkách. Nicméně role NO při omezení oxidativního poškození projevujícího se oxidací proteinů a lipidů během senescence nebyla jasně potvrzena. Bylo ale prokázáno, že za normálních nestresových podmínek byla míra oxidovaných proteinů a lipidů u *nos1* mutant vyšší (Guo and Crawford, 2005). Data nicméně naznačují, že nadměrná akumulace ROS a rozsáhlejší oxidativní poškození *nos1* mutantních rostlin ve výsledku znamená jejich větší náchylnost k senescenci.

### 3.3.2. Indukovatelná senescence působením $\text{H}_2\text{O}_2$ a methyljasmonátu

Pokusy s listy rýže (*Oryza sativa*) ukázaly, že NO působí proti senescenci vyvolané aplikací  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Její průběh v oddělených rýžových listech byl za těchto podmínek provázen zejména zvýšením obsahu samotného  $\text{H}_2\text{O}_2$ , peroxidací lipidů měřenou dle zvýšené koncentrace malondialdehydu (MDA), degradací proteinů a zvýšením aktivity antioxidantních enzymů peroxidasy (POD), askorbátperoxidasy (APOD) a glutathionreduktasy (GR). Přidání donorů NO PBN, Sin-1 a SNP ukázalo, že uvolněný NO dokázal omezit degradaci proteinů, obsah  $\text{H}_2\text{O}_2$  v listech a snížit aktivitu antioxidantních enzymů. V tomto případě byl prokázán účinek NO jako antioxidantní molekuly schopné inhibovat senescenci vyvolanou aplikací  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Hung and Kao, 2005).

K podobným výsledkům se došlo i při ošetření rostlin rýže (*Oryza sativa*) 45  $\mu\text{M}$  roztokem methyljasmonátu (MeJA). Takto podmíněná senescence rostlin inkubovaných ve tmě byla provázena degradací proteinů, zvýšením koncentrace  $\text{H}_2\text{O}_2$  a MDA spolu se snížením koncentrace antioxidantů kyseliny askorbové a glutathionu (GSH), a také navýšením aktivity APOD, POD, GR a CAT. Aplikace látek deaktivujících volné radikály, GSH a benzoátu sodného, dokázala snížit koncentraci  $\text{H}_2\text{O}_2$  a peroxidaci lipidů indukované aplikací MeJA. Je tedy pravděpodobné, že i senescence indukovaná MeJA je spojena s ROS, enzymy, které s jejich vznikem a funkcí souvisí a obecně oxidativním stresem. Následná aplikace donorů NO PBN, Sin-1 a SNP dokázala zvrátit výše zmíněné projevy senescence indukované MeJA, nejúčinnější byl PBN v koncentraci 100  $\mu\text{M}$ . Ověření vlivu NO na snížení koncentrace ROS bylo docíleno přidáním NO-deaktivující molekuly cPTIO, která zvrátila ochranný účinek NO na proces degradace proteinů a modulace antioxidantních enzymů spolu s koncentrací antioxidantů (Hung and Kao, 2004).

### 3.3.3. Represe produkce superoxidového radikálu

Tewari *et al.* (2009) zjistili, že orchidej *Phalaenopsis* podstupuje proces květní senescence v důsledku nadměrné aktivity enzymu xanthinoxidasy (XO), jejímž výsledkem je zvýšená produkce superoxidového radikálu  $O_2^{\cdot -}$  společně s  $H_2O_2$ . Akumulace těchto ROS vede k nadměrné peroxidaci lipidů, narušení buněčného redoxního prostředí a nakonec samotné senescenci. Společně se zvýšenou aktivitou XO bylo oproti mladým květům u starších zaznamenáno i zvýšení aktivity SOD, enzymu katalyzující přeměnu superoxidu na  $H_2O_2$ . Naopak se prokázalo snížení aktivity antioxidačních enzymů CAT a GR.

Exogenní aplikací donorů NO 100  $\mu$ M SNP a 100  $\mu$ M  $NaNO_2$  + kyseliny askorbové mělo za následek omezení senescence snížením aktivity XO, což vedlo k poklesu koncentrace  $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$  společně s peroxidací lipidů. Zároveň byla zvýšena aktivita CAT s GR. NO tedy hrál klíčovou roli při vzniku ROS a regulaci oxidativních/antioxidačních procesů, na kterých se podílely především XO, SOD, CAT a GR (Tewari *et al.*, 2009).

Dostupná data podporují předpoklad o úzkém propojení NO a ROS. Přes samotné ovlivnění vzniku ROS, jejich enzymatických přeměn a vlivu na buněčné komponenty, až po jejich deaktivaci NO dokáže modifikovat redoxní stav organel či celých buněk. Jeho možné antioxidační působení tedy může mít za následek ochranu buněk před stresem či senescencí.

### 3.4. Metabolismus NO v senescenci

Pokusy na transgenních rostlinách *Arabidopsis thaliana* Col-0, které exprimují bakteriální flavohemoglobin Hmp, poskytly důkaz o tom, že enzym degradující NO urychluje nástup senescence (Mishina *et al.*, 2007). Protein Hmp v bakterii *Escherichia coli* funguje jako NO dioxygenasa (NOD), enzym za aerobních podmínek přeměňující NO na  $NO_3^-$  v přítomnosti NAD(P)H (Poole and Hughes, 2000). Po 6 dnech od exprese NOD bylo žloutnutí listů, považované jako důkaz značného postupu senescence, viditelně silnější u transgenních Hmp rostlin s nižším obsahem NO v listových buňkách. Navození senescenčního fenotypu činností NOD bylo viditelnější u listů starších ve srovnání s mladšími. Pro ověření, že tento efekt byl opravdu způsoben nedostatkem NO, byly Hmp rostliny inkubovány za tmy v atmosféře obohacené o NO (4 ppm). U takto ošetřených rostlin bylo po 10 dnech možno pozorovat pouze slabé žloutnutí a vyšší obsah chlorofylu. Na rozdíl od rostlin inkubovaných v normální atmosféře, u nichž bylo žloutnutí a tím i ztráta chlorofylu výraznější. Nicméně efekt NO jako negativního regulátoru senescence se prokázal být koncentračně závislý. Při

inkubaci Hmp rostlin ve tmě a atmosféře s koncentrací  $\text{NO} \geq 10 \text{ ppm}$  bylo následně pozorováno poškození listů a jejich vysušení (Mishina *et al.*, 2007).

Porovnání senescence přirozené a indukované NOD prokázalo, že v obou dochází ke stejným buněčným pochodům mj. snížení exprese fotosyntetických genů, zvýšení exprese některých SAGs spolu s akumulací určitých metabolitů, např. SA. Nicméně fenotyp indukovaný expresí NOD je výsledkem urychlené senescence a některé výše popsané děje u Hmp rostlin probíhají v nadměrné míře, konkrétně akumulace SA. Tyto rozdíly jsou pravděpodobně dány regulovanějším a pozvolnějším úbytkem NO v listech během přirozené senescence (Mishina *et al.*, 2007).



**Obr. 5.** Inkubace transgenních Hmp rostlin *Arabidopsis thaliana* ve tmě a atmosféře obohacené o NO (4 ppm) po dobu 10 dnů zpomalilo postup senescence (vpravo). Naopak u rostlin kontrolních, inkubovaných v normální atmosféře bylo pozorovatelné viditelné žloutnutí listů a úbytek chlorofylu. Převzato z (Mishina *et al.*, 2007).

### 3.5. Genová exprese a její ovlivnění NO

Při výzkumu senescence byly identifikovány a popsány 4 skupiny genů s rozdílným profilem exprese zahrnující enzymy s funkcí regulační spolu s dalšími uplatňujícími se při degradaci buněčné stěny či chlorofylu. Skupina genů, které jsou svou funkcí vázány na senescenci a kdy dochází ke změně jejich exprese výhradně při tomto procesu, označujeme SAGs (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2003).

Exprese NO degradujícího enzymu NOD v transgenních Hmp rostlinách *Arabidopsis thaliana* navozuje senescenční fenotyp, jehož projevu předchází mohutná změna v genové expresi. Po 3-4 dnech exprese NOD s výsledkem omezeného obsahu NO v listových buňkách došlo ke snížení exprese fotosyntetických genů *CAB* (chlorophyll *a* a *b* binding protein) a malé podjednotky ribulosa-1,5-bifosfátkarboxylasy/oxygenasy *RBSC* (small subunit of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase). Ve stejnou dobu naopak došlo k posílení exprese typických SAGs. Mezi ně

patřil ribonukleasový gen *RNS2*, gen pro cysteinovou proteasu *SAG12* specifický pro senescenci, krátko-řetězcová alkoholdehydrogenasa *SAG13*, modrou měď vázající gen *SAG14*, *SAG 15*, *ERD1* (early responsive to dehydration 1) a *SAG20* s prozatím neznámou funkcí. Ověření, že tyto změny byly vyvolány senescencí v důsledku exprese NOD, poskytly kontrolní WT rostliny, u nichž nebylo pozorováno ani zeslabení exprese fotosyntetických genů, ani zesílení exprese SAGs (Mishina *et al.*, 2007).

### 3.6. Vliv $\text{Ca}^{2+}$ iontů

$\text{Ca}^{2+}$  ionty jsou jednou z nejdůležitějších komponent signalizačních drah a nacházejí své uplatnění i v regulaci senescence. Zkoumání *dnd1* (defense, no death1) mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana*, u nichž je nulová mutace v genu pro iontový kanál CNGC2 (cyclic nucleotide gated channel2), ukázalo propojení mezi  $\text{Ca}^{2+}$  ionty a následnou produkcí a signalizací NO během senescence. CNGC2 se uplatňuje během imunitních reakcí rostliny, ale hraje také roli v příjmu  $\text{Ca}^{2+}$  v listech během vývoje (Ma *et al.*, 2010).

Mutantní *dnd1* rostliny vykazovaly oproti kontrolám urychlený senescenční fenotyp doprovázený mj. ztrátou chlorofylu, zvýšenou hladinou  $\text{H}_2\text{O}_2$ , akumulací SA, nadměrnou peroxidací lipidů a posílenou expresí některých SAGs, např. *WRKY70*, *RLK5*, *At5g10760*. Spolu s těmito projevy byla u *dnd1* mutantů zjištěna i snížená endogenní hladina NO oproti WT rostlinám. Nabízí se tak možnost, že příjem  $\text{Ca}^{2+}$  kanálem CNGC2 a následná downstream regulace syntézy NO napomáhá k pozdržení senescence. Aplikace donoru NO SNP na *dnd1* mutanty měla za následek oddálení vzniku senescenčního fenotypu spojeného s výše zmíněnými buněčnými projevy (Ma *et al.*, 2010). Tyto výsledky podporují hypotézu o roli NO jako negativního regulátoru senescence přičemž se ukazuje, že jeho produkce v rostlinných tkáních může být ovlivňována na mnoha úrovních.

### 3.7. NO jako obrana proti senescenci

#### 3.7.1. Vodní deficit

Jak již bylo zmíněno, rostlina během svého života integruje endogenní signály spolu s těmi z vnějšího prostředí. A v případě stresových podmínek, mezi které můžeme zařadit i nedostatek vody, tak může dojít k navození senescence (Gan and Amasino, 1997).

Možné ochranné působení NO proti senescenci v důsledku vodního deficitu bylo zkoumáno na oddělených listech rýže (*Oryza sativa*). Vodní deficit byl navozen buď dehydratací, působením polyethylenglykolu (PEG) nebo sorbitolu (ST). Rozsah senescence indukované těmito podmínkami byl

měřen dle míry ztráty proteinů, změny koncentrace MDA a aktivity SOD. Použité donory NO PBN, SNP a Sin-1 úspěšně inhibovaly senescenci rýžových listů vystavených dehydrataci a působení PEG. Nicméně v případě ST neměly donory na senescenci žádný vliv. Při ošetření rostlin PEG nebo vystavení dehydrataci byla nejúčinnější koncentrace donoru PBN zabraňující ztrátě proteinů v listech 100  $\mu$ M. Molekula deaktivující NO cPTIO dokázala úspěšně zvrátit ochranné účinky donorů NO u stresovaných rostlin. Bylo tedy potvrzeno, že inhibice senescence byla dána působením NO. Senescenci vyvolanou u listů rýže ošetřením PEG či vystavení dehydrataci provázelo navýšení obsahu MDA jako indikátoru peroxidace lipidů a zároveň snížení aktivity SOD. Ošetření listů PBN redukovalo jak navýšení MDA tak snížení aktivity SOD, ale tento efekt byl omezen aplikací cPTIO. Působení sorbitolu nemělo na koncentraci MDA ani na aktivitu SOD žádný vliv (Cheng *et al.*, 2002). Z výše uvedených dat vyplývá, že NO působí ochranně v období vodního deficitu snížením peroxidace lipidů a zvýšením aktivity SOD.

### 3.7.2. ABA

Možné uplatnění ABA jako jednoho z důležitých fytohormonů ovlivňujících rostlinnou fyziologii i při procesu senescence bylo zkoumáno především v souvislosti s fungováním průduchů. Při inkubaci listových segmentů ovsa (*Avena sativa* cv. Victoria) ve tmě, kdy byly průduchy uzavřeny, byla po 2 dnech naměřena koncentrace ABA v průměru 5x vyšší než na světle, kdy byly průduchy otevřeny. Tento nárůst zároveň odpovídal největšímu úbytku chlorofylu provázející postup senescence. Po umístění listů na světle v experimentálním roztoku zabraňujícím vodnímu stresu, ale přidání 1 M manitolu, který navodil stres osmotický, došlo k rychlému uzavírání průduchů. Byl pozorován úbytek chlorofylu s maximem po 2 dnech a opět korespondující nárůst koncentrace ABA. Aplikace kinetinu v množství 3 až 6 mg/l zvrátila účinky manitolu, takže k uzavírání průduchů ani zvýšení obsahu ABA v listových segmentech nedošlo. Měníci se koncentrace ABA souvisí mj. s pohybem průduchů a její nárůst během kultivace listových segmentů v tmavých podmínkách, které navozují senescenci, tak naznačují její roli v tomto procesu (Gepstein and Thimann, 1980).

Exogenní přímá aplikace roztoku 45  $\mu$ mol/l ABA navodila u listů rýže (*Oryza sativa*) senescenci. Po jednom dni byla zjištěna zvýšená koncentrace  $H_2O_2$ , která předcházela degradaci proteinů a nárůstu koncentrace MDA jako indikátoru peroxidace lipidů, ke kterému došlo po 2 dnech. Dále byla pozorována zvýšená aktivita antioxidantních enzymů CAT, SOD, APOD a GR spolu se snížením koncentrace antioxidantů kyseliny askorbové a redukované formy glutathionu. Senescence indukovaná ABA je tedy provázena peroxidací lipidů a oxidativním stresem (Hung and Kao, 2003).



Vzhledem k antioxidačním účinkům NO, které byly prokázány např. při zabránění PCD indukované gibereliny v aleuronových vrstvách semen ječmene (*Hordeum vulgare*) (Beligni *et al.*, 2002) byly aplikovány různé donory NO s cílem omezit projevy senescence indukované ABA. Všechny donory NO PBN, Sin-1 a SNP efektivně inhibovaly senescenci rýžových listů vyvolanou aplikací 45  $\mu\text{M}$  ABA. Nebyl pozorován nárůst koncentrace MDA,  $\text{H}_2\text{O}_2$  a nedošlo ani ke zvýšení aktivity antioxidačních enzymů spolu s poklesem koncentrace antioxidantů. Aplikace specifické NO-deaktivující molekuly cPTIO zvrátila ochranný efekt PBN. Nejúčinnější koncentrace tohoto donoru omezující projevy senescence se ukázala být 100  $\mu\text{M}$  (Hung and Kao, 2003).

### 3.8. NO v interakci s ethylenem

#### 3.8.1. Fyziologické studie

Role NO jako faktoru zpomalující postup senescence byla zkoumána i vzhledem k jeho spojitosti s plynným hormonem ethylenem. V senescentních listech hrachu (*Pisum sativum* Linn.) byl monitorován vznik NO spolu s ethylenem za přítomnosti kyseliny aminocyklopropan-1-karboxylové (ACC) jako ethylenového prekursoru, a následně i bez něj. V nepřítomnosti ACC byla produkce obou látek snižena, nicméně emise NO byly v porovnání s ethylenem celkově vyšší. Po přidání donoru NO SNAP o koncentraci  $2 \times 10^{-3}$  M do média došlo k výraznému poklesu vzniku ethylenu. Tyto výsledky naznačily vzájemné metabolické propojení, kdy zvyšující se koncentrace NO měla za následek redukovanou produkci ethylenu (Leshem and Haramaty, 1996).

Dokumentovaný pokles koncentrace NO v dospívajících a senescentních tkáních byl doprovázen stechiometrickým nárůstem emise ethylenu. A naopak přidání donorů NO PBN a Sin-1 o koncentraci  $10^{-3}$  M do média, ve kterém se kultivovaly květní orgány karafiátů (*Dianthus caryophyllus*) spolu s prekurzorem ethylenu ACC se zjistilo, že toto množství nejúčinněji zvrátilo senescenci indukovanou ACC, kterou provází projevy jako hnědnutí a vadnutí okvětních lístků. Navýšení dlouhověkosti vegetativních částí společně s květy a plody by tedy mohlo být dosaženo mj. i snížením endogenní produkce ethylenu, případně znecitlivění tkání k jeho působení (Leshem *et al.*, 1998).

#### 3.8.2. Genetické studie

Zkoumání mutantů *etr1-1 Arabidopsis thaliana*, které jsou necitlivé k ethylenu, ukázalo, že tyto rostliny vykazovaly zpožděný nástup senescence společně se zpožděnou expresí některých SAGs. Nicméně bylo navrženo, že vnímání ethylenu je spojeno i s věkově závislými faktory specifickými pro senescenci. (Grbic and Bleeker, 1995). NOS1/NOA1 a jeho role v biosyntéze NO stále není úplně

objasněna, přestože je známo, že se nejedná o typickou NOS (Moreau *et al.*, 2008). Nicméně mutace v tomto proteinu způsobují znatelnou redukci produkce NO u rostlin *Arabidopsis thaliana* a *nos1* mutanty projevují dřívější senescenční fenotyp (Guo and Crawford, 2005).

Protein ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2) funguje jako pozitivní regulátor senescence, kdy mutované rostliny, podobně jako *etr1-1*, vykazují zpožděnou senescenci. Konstrukce a zkoumání dvojitých mutantů rostlin *Arabidopsis thaliana ein2-1 nos1/noa1* během senescence indukované tmou tak napomohlo k rozšíření poznatků o vzájemných interakcích NO a ethylenu, kdy tyto mutanty vykazovaly zpožděný senescenční fenotyp. Žloutnutí oddělených listů z 3 týdnů starých rostlin *ein2-1 nos1/noa1* bylo po 4 dnech kultivace ve tmě oproti *nos1/noa1* rostlinám výrazně omezeno. Obdobně obsah chlorofylu byl po 4-5 dnech v tmavých podmínkách u *ein2-1 nos1/noa1* na hodnotě 60 % původního oproti poklesu k méně než 20 % u rostlin *nos1/noa1*. Měřením fotochemické účinnosti odpovídající maximálnímu množství světla, které fotosystém II (PSII) může přijmout a zpracovat byla zjištěna její velmi snížená hodnota v případě *nos1/noa1* mutantů, zatímco u *ein2-1 nos1/noa1* rostlin byla v optimu. Tento konkrétní výsledek naznačuje, že během senescence indukované tmou EIN2 působí downstream od NOS1/NOA1. Dále byl zkoumán i stav chloroplastů, přičemž thylakoidní struktury *nos1/noa1* mutantů byly po 4 dnech kultivace ve tmě téměř degradovány, zatímco u *ein2-1 nos1/noa1* bylo stále pozorovatelné i uspořádání do thylakoidů stromálních a granálních (Niu and Guo, 2012). Tyto výsledky nastínily možnost, že NO hraje důležitou roli právě při udržování stability a integrity thylakoidních membrán během procesu senescence.

Pro další zkoumání uplatnění EIN2 spolu s NOS1/NOA1 v senescenci byla provedena analýza exprese některých typických SAGs a jejich příslušných transkripčních faktorů u WT, *nos1/noa1*, *ein2-1* a *ein2-1 nos1/noa1* rostlin v tmavých podmínkách. Výrazně zvýšená exprese transkripčních faktorů *NAP*, *NAC2*, *WRKY6* byla v porovnání s WT, *ein2-1* i *ein2-1 nos1/noa1* rostlinami pozorována pouze u *nos1/noa1* mutantů (Niu and Guo, 2012). Tyto výsledky naznačují, že EIN2 u *nos1/noa1* mutantů inhibuje časnou aktivaci některých SAGs.

Vzhledem k objevu, že NOS1/NOA1 reguluje senescenci mj. přes protein EIN2 se testovalo, jestli mutace v NOS1/NOA1 mohou mít vliv na ethylenem řízené signální dráhy. Zajímavou skutečností bylo zjištění, že celkově nízká hladina NO nemá u *nos1/noa1* mutantů vliv na typickou trojitou odpověď na přítomnost ethylenu zahrnující trpasličí vzrůst, krátké kořeny a bohaté kořenové vlášení. Naopak rostliny *ein2-1* spolu s *ein2-1 nos1/noa1* vykazovaly fenotyp necitlivý k ethylenu (Niu and Guo, 2012). Celkově lze tedy říci, že NO signály jsou přenášeny mj. pomocí EIN2 a ve výsledku se podílí na regulaci exprese některých SAGs během listové senescence.

### 3.9. Cytokininy

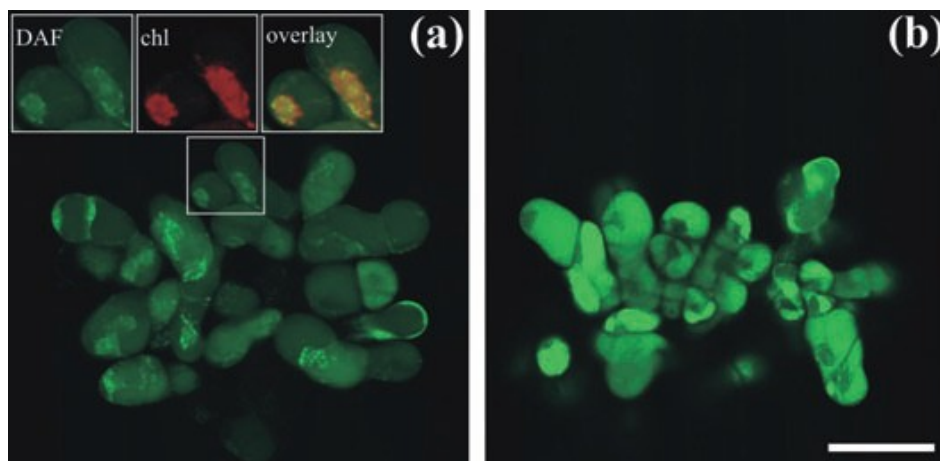
#### 3.9.1. Inhibice senescence

Připojení promotoru senescenčně – specifického genu *SAG12* ( $P_{SAG12}$ ) ke kódujícímu regionu isopentenyltransferasy (IPT), enzymu katalyzujícímu vznik cytokininů, a jeho následnou expresí došlo k potlačení senescence. U rostlin *Nicotiana tabacum* se tak dosáhlo autoregulačního systému bez negativních vlivů na další vývojové procesy rostliny. Při nástupu senescence  $P_{SAG12}$  aktivoval transkripci IPT a docházelo ke zvýšení koncentrace cytokininů. Ty následně zabránily senescenci, což zpětně vedlo ke snížení až zastavení exprese  $P_{SAG12}$ -IPT. Transgenní rostliny vykazovaly vyšší produkci biomasy, semen a také prodlouženou dobu přežití oddělených listů. Cytokininy se tak ukázaly být dalším endogenním regulátorem senescence (Gan and Amasino, 1995).

#### 3.9.2. NO signalizace

Zkoumáním účinků cytokininu 6-benzylaminopurinu (BA) na buněčné kultury *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že při dostatečně velkých dávkách BA indukoval PCD skrze urychlení senescence, a že jeho přidání ve srovnání s kontrolami podporovalo vznik NO. Přidání BA o koncentracích 13  $\mu$ M a 27  $\mu$ M k 3 dny starým buňkám mělo za následek redukci růstu o 50 % a 20 % spolu s následnou indukcí PCD, která po 4 dnech činila 29 % a 41 %. Kultivace buněk s NO – deaktivující molekulou cPTIO redukovala akumulaci NO, podpořila buněčný růst a omezila buněčnou smrt. Bylo tak prokázáno, že PCD indukovaná BA vyžaduje přítomnost NO. V buňkách ošetřených BA o koncentraci 13  $\mu$ M došlo v mitochondriích k omezení spotřeby  $O_2$  oproti kontrolám o 36 %. Přidáním cPTIO se tomuto poklesu zabránilo a zjistilo se tak, že NO se přímo podílí na omezení respirace (Carimi *et al.*, 2005).

Při kultivaci částečně simulující přirozenou senescenci probíhající po dobu 3 týdnů se v buněčných kulturách sledovala celková produkce NO. Její nárůst byl dokumentován během exponenciální, stacionární růstové fáze i během následné fáze odumírání buněk. Tento nárůst předcházel buněčnou smrt spolu s fragmentací DNA. Po přidání NO – deaktivující molekuly společně s inhibitorem NOS bylo akumulaci NO zabráněno a jeho hladina byla dokonce nižší než u rostlin takto neošetřených. NO se tedy uplatňuje jak během přirozené, tak BA – indukované PCD/senescence (Carimi *et al.*, 2005). Tyto výsledky ukazují spolupráci zvýšené koncentrace cytokininů a NO během regulace senescenčního procesu, nicméně NO zde nevystupuje jako jeho negativní regulátor. Naopak zde funguje jako molekula navozující buněčné poškození vedoucí k senescenci urychlené.



**Obr. 6.** BA indukuje vznik NO v suspenzních buněčných kulturách *Arabidopsis thaliana*. Vizualizace NO proběhla pomocí NO-senzitivní sondy (DAF-FM-DA), schopné procházet buňkami. Tři dny staré buňky byly inkubovány s 27  $\mu\text{M}$  BA po dobu 2 hod a po přidání DAF-FM-DA byly pozorovány pod laserovým skenovacím mikroskopem. (a) DAF-FM-DA fluorescence kontrolních buněk. chl = autofluorescence chlorofylu. (b) DAF-FM-DA fluorescence buněk ošetřených BA s viditelným nárůstem produkce NO. Převzato a upraveno z (Carimi *et al.*, 2005).

### 3.10. NO a symbióza

Mimo uplatnění NO jako signálu během obranných reakcí rostlin vyvolaných přítomností patogenu (Delledonne *et al.*, 1998) byla zaznamenána jeho přítomnost i během ustanovení symbiózy mezi rostlinami z čeledi bobovitých (*Fabaceae*) a bakteriemi rodu *Rhizobium*. Vzájemná asociace bobovitých spolu s rhizobiálními bakteriemi vede k tvorbě specifických orgánů na kořenech rostlin zvaných hlízků, ve kterých se bakterie diferencují na bakteroidy se schopností vázat atmosférický dusík  $\text{N}_2$ . Na symbiotickém vztahu rostlin vojtěšky *Medicago truncatula* a bakterie *Sinorhizobium meliloti* se pomocí mutantních kmenů bakterií zkoumala přítomnost NO v dospělých hlízkách a jeho možná role při jejich senescenci. Použity byly bakterie s mutací v genu *hmp* pro flavohemoglobin, který detoxifikuje NO (Poole and Hughes, 2000) spolu s kmenem, který měl naopak expresi genu *hmp* zvýšenou (*hmp*<sup>+</sup>) (Cam *et al.*, 2012).

#### 3.10.1. Přítomnost NO v hlízkách

Fluorescenční detekce NO ukázala u *hmp* rostlin nárůst o 42 % oproti kontrolním rostlinám, zatímco v případě *hmp*<sup>+</sup> rostlin se jednalo o 26 % pokles. Bylo tak prokázáno, že NO je v dospělých hlízkách přítomen a že bakterie na něj reagují. Absence proteinu Hmp znamenala akumulaci NO, zatímco jeho tvorba měla za následek vysoký pokles hladiny NO v hlízkách (Cam *et al.*, 2012).

### 3.10.2. Senescence hlízek

Při monitorování endogenní hladiny NO bylo zjištěno, že v případě WT docházelo k viditelné senescenci hlízek kolem 4.-5. týdne od inokulace bakteriemi, přičemž po 9 týdnech bylo senescentních 80 % hlízek. U *hmp* rostlin s vyšší endogenní hladinou NO byl proces rychlejší a po 4 týdnech se dalo označit za senescentní již 40 % hlízek. První známky senescence hlízek u *hmp*<sup>+</sup> rostlin, které měly sníženou endogenní hladinu NO, se objevily až po 6 týdnech od inokulace a po 9 týdnech bylo možno označit za senescentní pouze 35 %. Cytologické změny provázející senescenci byly u *hmp*<sup>+</sup> hlízek detekovány až v 7.-8. týdnu což naznačilo, že degradace NO v dospělých hlízkách přispívá ke zpoždění nástupu tohoto procesu (Cam *et al.*, 2012). Celkově lze tedy říci, že předčasná hlízková senescence je doprovázena endogenním nárůstem hladiny NO, zatímco celý proces může být zpožděn odstraněním NO z tohoto orgánu.

### 3.11. Donory NO

Jedním z nejčastějších experimentálních postupů při studiu funkce NO v rostlinách se stala aplikace donorů NO. Nicméně následné metabolické odpovědi se různí dle variability ve schopnosti těchto látek NO uvolňovat a svou roli hrají i fyzikální a biologické podmínky v podobě světla a teploty. Pro ohodnocení charakteristik donorů NO SNP, GSNO a enzymu NOS bylo u rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. BelW3) použito dvou odlišných metod. Spektrofotometrické určení pomocí hemoglobinu, které pomohlo zjistit množství uvolněného NO v listových tkáních, a fluorometrické měření pomocí DAF-FM fluorescenční sondy pro zjištění koncentrace NO na buněčné úrovni (Ederli *et al.*, 2009).

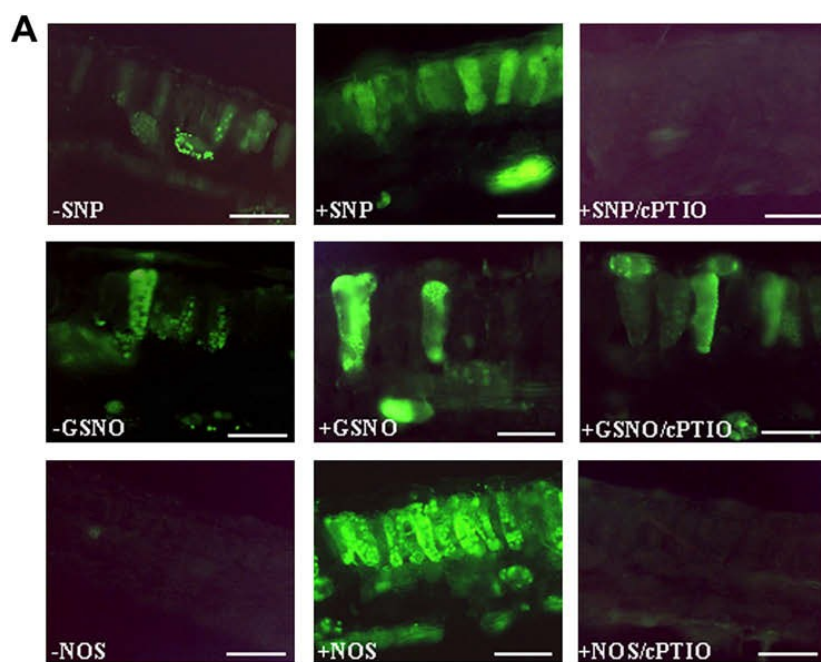
#### 3.11.1. *In vitro*

V médiu se jako efektivní donory NO ukázaly být SNP společně s GSNO. Produkce NO byla koncentračně závislá a svého maxima o hodnotě 32,66  $\mu\text{M m}^{-1}$  dosáhla po 3 hodinách od aplikace 5 mM SNP. V podmínkách *in vitro* se tedy ukázal být nejefektivnějším donorem, který poskytoval nejvíce NO a jehož vysoká produkce trvala po dobu 6 hodin, SNP (Ederli *et al.*, 2009).

### 3.11.2. *In planta*

Měření efektivity donorů NO přímo v listech tabáku přineslo odlišné výsledky. NOS vykazovala oproti měření v médiu vyšší produkci NO než SNP, zatímco u GSNO nebyla naměřena žádná produkce. Následné použití NO – deaktivující molekuly cPTIO tyto výsledky potvrdilo (Ederli *et al.*, 2009).

Při sledování biologických odpovědí na produkci NO byla monitorována mj. transkripční regulace mitochondriálního genu pro alternativní oxidasu *AOX1a*. V tomto případě pouze SNP a NOS dokázaly produkovat dostatek NO pro zvýšení akumulace mRNA transkriptů. Dále byl zkoumán vliv donorů NO na indukci buněčné smrti jejich aplikací na listové disky. Podíl usmrcených buněk po 3 hodinách v případě NOS a 5 mM SNP 54 % a 30 %. Aplikace GSNO neměla na indukci buněčné smrti žádný vliv (Ederli *et al.*, 2009). Prezentované výsledky naznačují, že oproti SNP a NOS se GSNO ukázal být pro produkci NO v listových tkáních neefektivní. Navíc přesto, že mechanismus vzniku NO se u SNP a NOS liší, podobné účinky na biologické vlastnosti naznačují, že obecně existuje určitá hranice pro vnímání zvýšené koncentrace NO.



**Obr. 7.** Vizualizace NO v tabákových listech (inkubovaných s DAF-FM) pomocí fluorescenčního mikroskopu po 2 hodinách od ošetření 5 mM SNP, GSNO, a  $1 \text{ U} \cdot \text{ml}^{-1}$  NOS. Z obrázku je patrná vyšší efektivita donorů NO SNP a NOS. Převzato a upraveno z (Ederli *et al.*, 2009).

## Závěr

Při výzkumu role NO v senescenci se nejprve zjišťoval jeho přirozený endogenní obsah v rostlinách. Ten se ukázal být v mladých tkáních oproti dospělým vyšší, přičemž s postupem senescence klesala i koncentrace NO. Působení rozmanitých stresových podmínek např. v podobě dehydratace, zvýšené koncentrace  $H_2O_2$ , ABA, MeJA či obyčejnou degradací NO v tkáních bylo dosaženo senescenčního fenotypu rostlin. Jeho vznik doprovázelo oxidativní poškození způsobené tvorbou  $O_2^{\cdot-}$  a  $H_2O_2$  s následným ovlivněním buněčných proteinů a lipidů. Přítomnost vhodné koncentrace NO navozená buď jeho exogenní aplikací, popř. vytvořením mutantních či transgenních rostlin dokázala úspěšně zvrátit procesy vedoucí k tvorbě senescenčního fenotypu. Byla potvrzena i těsná vazba NO na plyný hormon ethylen, který je znám jako molekula navozující senescenci. Antagonistické působení NO a ethylenu pouze dále potvrdilo, že NO ve většině případů hraje roli negativního regulátoru senescence.

V interakci s vysokou koncentrací cytokininů může NO vystupovat naopak i jako molekula urychlující postup senescence vedoucí k PCD. Během zkoumání symbiotických vztahů mezi bobovitými rostlinami a bakteriemi z rodu *Rhizobium* bylo zjištěno, že nárůst hladiny NO podobně způsoboval předčasnou senescenci hlízek.

Nicméně většina experimentů přinesla výsledky potvrzující, že určité navýšení obsahu NO v rostlinných tkáních dokáže zvrátit proces senescence a prodloužit životnost jak celých rostlin tak pouze vybraných orgánů. Nejjednodušším způsobem modulace koncentrace v rostlinách se ukázala být exogenní aplikace donorů NO. A přestože jejich použití může ve větším měřítku představovat technické komplikace, nabízí se zde možnost pro uplatnění NO v rostlinné produkci s pozitivním účinkem na životnost a plodnost rostlin.

## Citovaná literatura

- Beligni, M. V., A. Fath, P. C. Bethke, L. Lamattina, and R. L. Jones. 2002.** Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiology* **129**:1642-1650.
- Beligni, M. V., and L. Lamattina. 1999.** Is nitric oxide toxic or protective? *Trends in Plant Science* **4**:299-300.
- Beligni, M. V., and L. Lamattina. 2000.** Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**:215-221.
- Bethke, P. C., M. R. Badger, and R. L. Jones. 2004.** Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* **16**:332-341.
- Billiar, T. R. 1995.** Nitric-oxide - novel biology with clinical relevance. *Annals of Surgery* **221**:339-349.
- Buchanan-Wollaston, V., S. Earl, E. Harrison, E. Mathas, S. Navabpour, T. Page, and D. Pink. 2003.** The molecular analysis of leaf senescence - a genomics approach. *Plant Biotechnology Journal* **1**:3-22.
- Butler, A. R., F. W. Flitney, and D. L. H. Williams. 1995.** NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothiols and iron-nitrosyls in biology - a chemists perspective. *Trends in Pharmacological Sciences* **16**:18-22.
- Cam, Y., O. Pierre, E. Boncompagni, D. Herouart, E. Meilhoc, and C. Bruand. 2012.** Nitric oxide (NO): a key player in the senescence of Medicago truncatula root nodules. *New Phytologist* **196**:548-560.
- Carimi, F., M. Zottini, A. Costa, I. Cattelan, R. De Michele, M. Terzi, and F. Lo Schiavo. 2005.** NO signalling in cytokinin-induced programmed cell death. *Plant Cell and Environment* **28**:1171-1178.
- Cecconi, D., S. Orzetti, E. Vandelle, S. Rinalducci, L. Zolla, and M. Delledonne. 2009.** Protein nitration during defense response in Arabidopsis thaliana. *Electrophoresis* **30**:2460-2468.
- Cheng, F. Y., S. Y. Hsu, and C. H. Kao. 2002.** Nitric oxide counteracts the senescence of detached rice leaves induced by dehydration and polyethylene glycol but not by sorbitol. *Plant Growth Regulation* **38**:265-272.
- Corpas, F. J., J. B. Barroso, A. Carreras, M. Quiros, A. M. Leon, M. C. Romero-Puertas, F. J. Esteban, R. Valderrama, J. M. Palma, L. M. Sandalio, M. Gomez, and L. A. del Rio. 2004.** Cellular and subcellular localization of endogenous nitric oxide in young and senescent pea plants. *Plant Physiology* **136**:2722-2733.
- Delledonne, M., Y. J. Xia, R. A. Dixon, and C. Lamb. 1998.** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* **394**:585-588.
- Durner, J., D. Wendehenne, and D. F. Klessig. 1998.** Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:10328-10333.
- Ederli, L., L. Reale, L. Madeo, F. Ferranti, C. Gehring, M. Fornaciari, B. Romano, and S. Pasqualini. 2009.** NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta. *Plant Physiology and Biochemistry* **47**:42-48.
- Gan, S. S., and R. M. Amasino. 1995.** Inhibition of leaf senescence by autoregulated production of cytokinin. *Science* **270**:1986-1988.
- Gan, S. S., and R. M. Amasino. 1997.** Making sense of senescence - molecular genetic regulation and manipulation of leaf senescence. *Plant Physiology* **113**:313-319.
- Gepstein, S., and K. V. Thimann. 1980.** Changes in the abscisic-acid content of oat leaves during senescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* **77**:2050-2053.
- Gould, K. S., O. Lamotte, A. Klinguer, A. Pugin, and D. Wendehenne. 2003.** Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell and Environment* **26**:1851-1862.
- Grbic, V., and A. B. Bleeker. 1995.** Ethylene regulates the timing of leaf senescence in Arabidopsis. *Plant Journal* **8**:595-602.
- Guo, F. Q., and N. M. Crawford. 2005.** Arabidopsis nitric oxide synthase1 is targeted to mitochondria and protects against oxidative damage and dark-induced senescence. *Plant Cell* **17**:3436-3450.
- Guo, F. Q., M. Okamoto, and N. M. Crawford. 2003.** Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* **302**:100-103.
- He, Y. K., R. H. Tang, Y. Hao, R. D. Stevens, C. W. Cook, S. M. Am, L. F. Jing, Z. G. Yang, L. G. Chen, F. Q. Guo, F. Fiorani, R. B. Jackson, N. M. Crawford, and Z. M. Pei. 2004.** Nitric oxide represses the Arabidopsis floral transition. *Science* **305**:1968-1971.
- Hung, K. T., and C. H. Kao. 2003.** Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid. *Journal of Plant Physiology* **160**:871-879.
- Hung, K. T., and C. H. Kao. 2004.** Nitric oxide acts as an antioxidant and delays methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves. *Journal of Plant Physiology* **161**:43-52.
- Hung, K. T., and C. H. Kao. 2005.** Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by hydrogen peroxide. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **46**:21-28.



**Jasid, S., A. Galatro, J. J. Villordo, S. Puntarulo, and M. Simontacchi. 2009.** Role of nitric oxide in soybean cotyledon senescence. *Plant Science* **176**:662-668.

**Leshem, Y. Y., and E. Haramaty. 1996.** The characterization and contrasting effects of the nitric oxide free radical in vegetative stress and senescence of *Pisum sativum* Linn foliage. *Journal of Plant Physiology* **148**:258-263.

**Leshem, Y. Y., R. B. H. Wills, and V. V. V. Ku. 1998.** Evidence for the function of the free radical gas - nitric oxide (NO<sup>•</sup>) - as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**:825-833.

**Lindermayr, C., G. Saalbach, and J. Durner. 2005.** Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **137**:921-930.

**Ma, W., A. Smigel, R. K. Walker, W. Moeder, K. Yoshioka, and G. A. Berkowitz. 2010.** Leaf senescence signaling: the Ca<sup>2+</sup>-conducting *Arabidopsis* cyclic nucleotide gated channel2 acts through nitric oxide to repress senescence programming. *Plant Physiology* **154**:733-743.

**Mishina, T. E., C. Lamb, and J. Zeier. 2007.** Expression of a nitric oxide degrading enzyme induces a senescence programme in *Arabidopsis*. *Plant Cell and Environment* **30**:39-52.

**Moreau, M., G. I. Lee, Y. Wang, B. R. Crane, and D. F. Klessig. 2008.** AtNOS/AtNOA1 is a functional *Arabidopsis thaliana* cGTPase and not a nitric-oxide synthase. *Journal of Biological Chemistry* **283**:32957-32967.

**Moreau, M., C. Lindermayr, J. Durner, and D. F. Klessig. 2010.** NO synthesis and signaling in plants - where do we stand? *Physiologia Plantarum* **138**:372-383.

**Mulaudzi, T., N. Ludidi, O. Ruzvidzo, M. Morse, N. Hendricks, E. Iwuoha, and C. Gehring. 2011.** Identification of a novel *Arabidopsis thaliana* nitric oxide-binding molecule with guanylate cyclase activity in vitro. *Febs Letters* **585**:2693-2697.

**Neill, S., J. Bright, R. Desikan, J. Hancock, J. Harrison, and I. Wilson. 2008.** Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany* **59**:25-35.

**Niu, Y. H., and F. Q. Guo. 2012.** Nitric oxide regulates dark-induced leaf senescence through EIN2 in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**:516-525.

**Poole, R. K., and M. N. Hughes. 2000.** New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Molecular Microbiology* **36**:775-783.

**Stohr, C., F. Strube, G. Marx, W. R. Ullrich, and P. Rockel. 2001.** A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* **212**:835-841.

**Tewari, R. K., P. Kumar, S. Kim, E. J. Hahn, and K. Y. Paek. 2009.** Nitric oxide retards xanthine oxidase-mediated superoxide anion generation in *Phalaenopsis* flower: an implication of NO in the senescence and oxidative stress regulation. *Plant Cell Reports* **28**:267-279.

**Yamasaki, H. 2000.** Nitrite-dependent nitric oxide production pathway: implications for involvement of active nitrogen species in photoinhibition in vivo. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences* **355**:1477-1488.

**Yamasaki, H., and Y. Sakihama. 2000.** Simultaneous production of nitric oxide and peroxynitrite by plant nitrate reductase: in vitro evidence for the NR-dependent formation of active nitrogen species. *Febs Letters* **468**:89-92.